



УДК 577.152.313*1.04 + 541.182

© 1991 г.

*С. П. Наметкин, А. В. Кабанов, Н. Л. Глячко,
А. В. Левашов*

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА В ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛАХ ПАВ В ОРГАНИЧЕСКОМ РАСТВОРИТЕЛЕ

*Кафедра химической энзимологии Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Изучена регуляция надмолекулярной структуры и каталитической активности димерного фермента — щелочной фосфатазы из кишечника телянка в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ (АОТ) в октане. Зависимость каталитической активности фермента от степени гидратации (размера мицелл) имеет вид кривой с двумя максимумами, которые наблюдаются при степенях гидратации $[H_2O]/[АОТ] = 17$ и 25 , т. е. в условиях, когда радиус внутренней полости обращенных мицелл соответствует размерам мономера ($M_r = 70\ 000$) и димера ($M_r = 140\ 000$) щелочной фосфатазы. Методом скоростной седиментации установлено, что при изменении степени гидратации происходит обратимая диссоциация фермента на субъединицы, причем первый из указанных выше максимумов соответствует функционированию мономерной формы, а второй — димерной формы фермента.

Белок-белковые взаимодействия играют исключительно важную роль в регуляции ферментативной активности. В случае олигомерных ферментов взаимодействие белковых субъединиц не только определяет такие важнейшие свойства, как способность к аллостерической регуляции [1, 2], но часто составляет необходимое условие для проявления самой ферментативной функции [3].

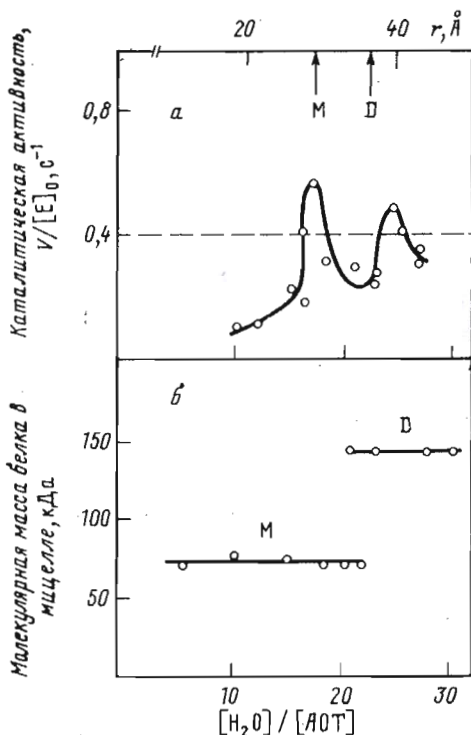
Экспериментальное изучение роли объединения субъединиц в олигомерных ферментах ограничивается отсутствием надежных и универсальных подходов, позволяющих регулировать состав исследуемых белковых комплексов: искусственно осуществлять их сборку или, наоборот, разрушение. Разделение на субъединицы *in vitro* часто наблюдается только в денатурирующих условиях, что существенно затрудняет возможность исследования каталитических свойств отдельных субъединиц [4, 5].

Особенно методически сложным является выяснение роли объединения субъединиц в олигомерных ферментах в случае идентичных субъединиц. Так, функции каждой из субъединиц в димере широко исследованного фермента — щелочной фосфатазы — и каталитические свойства ее изолированных субъединиц на сегодняшний день неизвестны, несмотря на многочисленные исследования [6—8].

Как было показано ранее, подобные задачи могут быть решены при использовании в качестве среды для ферментативной реакции систем гидратированных обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях [9—11]. При солюбилизации в таких системах фермент включается во внутреннюю водную полость мицелл, сохраняя при этом каталитическую активность [12]. Размер внутренней полости мицелл можно варьировать в широком диапазоне (от десятка до сотен и более ангстрем), изменяя степень гидратации ПАВ (w_0) — молярное отношение $[вода]/[ПАВ]$ в системе [13—15]. Таким образом, в обращенной мицелле при различных степенях гидратации может помещаться как одна молекула белка, так и крупные белковые комплексы. Иными словами, обращенные мицеллы могут служить

Принятые сокращения: ПАВ — поверхностно-активное вещество, аэрозоль ОТ (АОТ) — натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты.

Зависимость каталитической активности щелочной фосфатазы в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ в октане от степени гидратации (а) и регистрация мономерной (М) или димерной (D) формы фермента методом ультрацентрифугирования (б). Условия эксперимента см. в «Экспер. части». Штриховой линией показано значение каталитической активности фермента в водном растворе, измеренное в условиях рН-оптимума реакции. Для сравнения приведена шкала средних радиусов (r) внутренней полости обращенных мицелл [18]. Стрелками отмечены значения радиусов мономера (М) и димера (D) щелочной фосфатазы



матрицами регулируемого размера для сборки белковых комплексов различного состава.

Возможности мицеллярных систем были показаны на примере различных олигомерных ферментов: лактатдегидрогеназы [16], состоящей из четырех идентичных субъединиц, и γ -глутамилтрансферазы [17] — гетеродимерного фермента.

В настоящей работе представлены результаты изучения закономерности регуляции активности щелочной фосфатазы в системе обращенных мицелл аэрозоля ОТ в октане.

Зависимость каталитической активности щелочной фосфатазы от степени гидратации. Один из наиболее ярких эффектов, обнаруживаемых при изучении катализа ферментами в системах обращенных мицелл, — это зависимость каталитической активности от степени гидратации ПАВ, параметра, определяющего размер внутренней водной полости обращенных мицелл [11]. К настоящему времени эти зависимости изучены почти для 20 ферментов. Несмотря на значительное разнообразие исследованных ферментных систем, наблюдаемые зависимости оказываются весьма схожими: как правило, они имеют колоколообразный вид [9—11]. Максимум каталитической активности обнаруживается при той степени гидратации, когда радиус внутренней полости мицелл равен радиусу белковой глобулы [10, 18].

Мы изучили закономерности регуляции каталитической активности щелочной фосфатазы из кишечника теленка изменением степени гидратации в системе обращенных мицелл АОТ в октане. Для этого фермента на зависимости каталитической активности от w_0 наблюдается не один, а два максимума при w_0 17 и 25 (рисунок, а).

При w_0 17 радиус внутренней полости мицелл равен радиусу мономера щелочной фосфатазы ($M_r = 70$ кДа), а при w_0 25 приблизительно равен радиусу ее димерной формы ($M_r = 140$ кДа), рассчитанного в предположении, что димер имеет форму, близкую к сферической. Отметим, что арифметическая сумма радиусов двух субъединиц щелочной фосфатазы равна радиусу внутренней полости обращенных мицелл при w_0 36. (Радиусы мономерной и димерной форм оценивали по формуле

$$r = 0,7 \sqrt[3]{M_r},$$

где r и M_r — соответственно радиус и масса белковой глобулы [18].) Сопоставляя эти результаты с данными седиментационного анализа, свидетельствующими об обратимом переходе щелочной фосфатазы из мономерной в димерную форму при w_0 22 (рисунок, б), можно сделать вывод, что наблюдаемые максимумы обусловлены функционированием соответственно мономера и димера фермента.

Следует отметить, что в литературе сложилось мнение о том, что щелочная фосфатаза может функционировать только в димерной форме. Попытки разделения субъединиц фермента традиционными методами приводили к его полной инактивации [6—8]. Это, вероятно, обусловлено тем, что разделение субъединиц щелочной фосфатазы в водном растворе происходит только в относительно жестких условиях (в присутствии 6 М гуанидинхлорида) [6—8]. Использование же систем обращенных мицелл позволяет осуществить «разборку» олигомерного фермента на субъединицы в неденатурирующих условиях.

Экспериментальная часть

Щелочную фосфатазу (КФ 3.1.3.1) из кишечника телят (Sigma, США) очищали гель-фильтрацией на смоле Toyopearl TSK-45 (Toyo Soda, Япония) и гидрофобной хроматографией на октил-силохроме (НПО «Фермент», Вильнюс). Активность выделенного фермента составляла 1,1 ед./мг (одна единица соответствует активности, при которой за 1 мин гидролизует 1 мкмоль *n*-нитрофенилфосфата при рН 10,4 и 25° С).

Аэрозоль ОТ (Merck, ФРГ) использовали без дополнительной очистки. Методом ИК-спектроскопии [19] установлено, что в этом препарате содержится 0,5 моль воды на 1 моль АОТ.

n-Нитрофенилфосфат — препарат фирмы Sigma (США).

Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства.

Измерение скорости ферментативной реакции в системе обращенных мицелл [19] проводили по стандартной методике [10, 11]. В 2 мл 0,1 М раствора АОТ в октане солиubilizировали щелочную фосфатазу (5—20 мкл 5—150 мкМ раствора) и *n*-нитрофенилфосфат (10—100 мкл 10—250 мМ раствора) в карбонатном буфере, рН 10,5.

Скорость реакции образования *n*-нитрофенолят-иона определяли спектрофотометрически при 400 нм и 25° С. (В независимом эксперименте измеряли молярные коэффициенты поглощения *n*-нитрофенолят-иона в системе обращенных мицелл при различных значениях рН и степенях гидратации.) Использовали спектрофотометр Beckman 25 (США) с термостатируемым кюветным отделением. В работе анализируются рН-независимые значения приведенной максимальной скорости ($V/[E]_0$). Скорость реакции измеряли в условиях насыщения фермента субстратом.

Коэффициенты седиментации пустых и содержащих белок обращенных мицелл [20] определяли при 20° С на аналитической центрифуге Beckman, E, снабженной фотоэлектрическим сканирующим устройством с монохроматором и мультиплексором, с использованием 12-мм двухсекторных ячеек и ротора An-G-Ti при скорости 20 000—30 000 об/мин. При определении коэффициентов седиментации в системах, не содержащих белок, мицеллярный раствор «окрашивали» 20 мкМ пикриновой кислотой. В этом случае сканирование проводили при 400 нм. В случае систем, содержащих 4—10 мкМ белок, сканирование осуществляли при 280 нм (в этих условиях поглощение пустых мицелл не превышало 10% от поглощения мицелл, содержащих белок). Коэффициенты седиментации пустых и содержащих белок мицелл рассчитывали из экспериментальных данных по классической методике [20, 21].

Значения молекулярных масс белков, солиubilizированных в системе обращенных мицелл, рассчитывали по коэффициентам седиментации аналогично тому, как это описано в работе [17].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Werner M., Garret C., Chiu A., Klemperer L. // Clin. Chem. 1982. V.28. P. 2351—2358.
2. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978. С. 248.
3. Friedrich P. Supramolecular Enzyme Organization. Oxford: Pergamon Press, 1984. 300 P.
4. Kurganov B. I., Loboda N. I. // J. Theor. Biol. 1979. V. 111. P. 707—723.
5. Муронец В. И., Наградова Н. К. Иммуобилизованные олигомерные ферменты. М.: Наука, 1984. 208 с.
6. McCracken S., Meighen E. // Meth. Enzymol. 1987. V. 135. P. 492—501.
7. McCracken S., Meighen E. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 2396—2404.
8. McCracken S., Meighen E. // Can. J. Biochem. 1979. V. 57. P. 834—842.
9. Luisi P. L., Magid L. J. // CRC Crit. Rev. Biochem. 1986. V. 20. P. 409—474.
10. Martinek K., Klyachko N. L., Kabanov A. V., Khmel'nitsky Yu. L., Levashov A. V. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 981. P. 161—172.
11. Structure and Reactivity in Reverse Micelles / Ed. Pileni M. P. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier, 1989.
12. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 236. С. 920—923.
13. Zulauf M., Eicke H. F. // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. P. 480—486.
14. Fletcher P. D. I., Howe A. M., Perrins N. M., Robinson B. H., Torracioglou C., Dore J. C. // Surfactants in Solution. V. 2. / Eds Mittal K. L., Lindmann B. N. Y.: Plenum Press, 1984. P. 1745—1753.
15. Ravey J. C., Buzier M. // Surfactants in Solution. V. 2 / Eds Mittal K. L., Lindmann B. N. Y.: Plenum Press, 1984. P. 1759—1779.
16. Клячко Н. Л., Меркер Ш., Вакула С. В., Иванов М. В., Березин И. В., Левашов А. В., Мартинек К. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. С. 1479—1481.
17. Наметкин С. Н., Кabanov A. V., Евтушенко Г. Н., Чернов Н. Н., Березов Т. Т., Щеголев А. А., Рыжова В. В., Клячко Н. Л., Мартинек Т., Левашов А. В. // Био-орган. химия. 1989. Т. 15. С. 70—77.
18. Левашов А. В. // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 4. М.: ВИНТИ, 1987. С. 112—158.
19. Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К. // Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. С. 1019—1030.
20. Levashov A. V., Khmel'nitsky Yu. L., Klyachko N. L., Chernyak V. Yu., Martinek K. // J. Colloid Interface Sci. 1982. V. 88. P. 444—457.
21. Черняк В. Я. // Физико-химические методы в молекулярной биологии. М.: Изд-во МГУ, 1978. М. 65—95.

Поступила в редакцию
19.IX.1990

S. N. NAMETKIN, A. V. KABANOV, N. L. KLYACHKO, A. V. LEVASHOV

ALKALINE PHOSPHATASE IN REVERSED MICELLES OF SURFACTANTS
IN ORGANIC SOLVENTS

Department of Chemical Enzymology, Moscow State University

A dimeric enzyme (alkaline phosphatase from calf intestinal mucosa) was studied in the reversed micellar medium of Aerosol OT (AOT) in octane. The dependence of the enzyme's activity on the hydration degree (on the size of micelles) is a curve with two optima corresponding to the hydration degrees $[H_2O]/[AOT] = 17$ and 25; when the inner cavity radii of reversed micelles are equal to the size of the enzyme's monomer ($M_r = 70\ 000$) and of the dimer ($M_r = 140\ 000$). Ultracentrifugation experiments showed that a reversible dissociation of the enzyme into subunits takes place as a result of the change of the hydration degree; the first and second maxima corresponding to the functioning of the monomeric and dimeric forms of the enzyme, respectively.